

تنسيل مورثة الصدمة الحرارية GroEL لدى اليرسينيا والتعبير البروتيني لها باستخدام بلاسميد pHEN6 والتعبير البروتيني

لبنى أبو عسلي⁽¹⁾ و ابتسام حمد⁽²⁾ و عبد القادر عبادي⁽³⁾

⁽¹⁾ قسم علم الحياة النباتية - كلية العلوم - جامعة دمشق - سورية

⁽²⁾ قسم العلوم البيئية - كلية العلوم - جامعة دمشق - سورية

⁽³⁾ قسم البيولوجيا الجزيئية والتقانة الحيوية - هيئة الطاقة الذرية السورية - سورية

تاريخ الإبداع 2011/07/18

قبل للنشر في 2011/10/17

الملخص

اليرسينيا المعوية القولونية (*Yersinia enterocolitica*) هي جراثيم سالبة الغرام، ممرضة، داخل خلوية اختيارية، تتطفل على الخلايا البالعة للمضيف وتتمو ضمن الحويصلات الحالة، حيث تؤدي مجموعة من بروتينات اليرسينيا دورا مهما في تحمل الشروط القاسية ضمن الخلية، وأحد هذه البروتينات المهمة هو بروتين الصدمة الحرارية GroEL. كان هدفنا من هذه الدراسة إنتاج هذا البروتين مؤشبا بطرائق التنسيل، والتعبير البروتيني عنه وتنقيته بغية استخدامه مستقبلياً لدراسة الدور الذي يؤديه في دورة حياة الجرثوم وقدرته على التطفل وإمكانية استخدامه في محاربة داء اليرسينيات. فضلا عن ذلك فإن بروتين الـ GroEL من البروتينات التي تسهم باختراق البالعات الكبيرة خلال الإصابة، كما أنه واحد من البروتينات الإستمناعية المسيطرة في اليرسينيا.

استُخلص الـ DNA الجينومي من جراثيم اليرسينيا بعد تحديد نقاوة السلالات باستخدام PCR متعدد الشداف (*multiplex Yersinia*). وانطلاقاً من هذا الـ DNA ضُخمت مورثة الـ GroEL بواسطة تفاعل الـ PCR، وذلك باستخدام مُرئسات نوعية حاوية على موقعي قطع أنزيمي التقيد XbaI و BstEII في النهايتين '3' و'5'، على التوالي. بعدها تم لحام كل من المورثة المقطوعة والبلاسميد المقطوع pHEN6، وحورت جراثيم *E. coli* بنتائج عملية التنسيل. عبّرت المستعمرات الإيجابية عن بروتين الصدمة الحرارية المؤشَب (60 kDa) بشكله المنحل ضمن فراغ البلاسما المحيطية بحيث تمكنا من تنقيته باستخدام الكروماتوغرافيا ذات الإلفة المعدنية، وقد أثبتنا نقاء البروتين المؤشَب بترحيله على هلامة الأكريلاميد والكشف عنه إما بتلوينه بواسطة صبغة الكوماسي أو بطريقة التبرصيم المناعي باستخدام أضداد نوعية للذيل الهستيديني His-6×.

الكلمات المفتاحية: اليرسينيا، GroEL، التنسيل المورثي، pHEN6، التعبير البروتيني.

Cloning and protein expression of *Yersinia* GroEL using pHEN6 plasmid

L. Abo-Assali⁽¹⁾, I. Hamad⁽²⁾ and A.Q. Abbady⁽³⁾

⁽¹⁾ Department of Plant Biology, Faculty of Sciences, Damascus University, Syria

⁽²⁾ Department of Ecology, Faculty of Sciences, Damascus University, Syria

⁽³⁾ Department of Molecular Biology and Biotechnology, Atomic Energy Commission of Syria (AECS), Syria.

Received 18/07/2011

Accepted 17/10/2011

ABSTRACT

Yersinia enterocolitica is a gram negative, pathogenic, facultative intracellular bacterium. It parasites on macrophages and grows in phagosomes, in which a group of proteins plays critical roles in tolerating stressful conditions within the cell. One of these important proteins is the heat shock protein (HSP) GroEL. In this work, we aimed to produce a recombinant GroEL protein by gene cloning and protein expression and purification, in order to use the recombinant protein in the future to study its function in the microbe life cycle and the possibility to use it against the yersinosis. Furthermore, beside being vital for macrophage penetration during infection, GroEL is one of the most immunodominant proteins of *Yersinia*.

Genomic DNA from *Y. enterocolitica* was extracted from a PCR-confirmed strain using *Yersinia* Multiplex PCR. From this genomic DNA, the GroEL gene was amplified by PCR using specific primers that contain the restriction sites XbaI and BstEII at 3' and 5' ends, respectively. The amplified and digested GroEL DNA fragment, as well as the digested pHEN6 plasmid, were ligated and then used to transform *E. coli* competent cells. The positive colonies expressed a soluble rGroEL protein (60 kDa) in the periplasmic space and this recombinant protein could be purified by metal affinity chromatography, as demonstrated by electrophoresis (SDS-PAGE 10%) and gel staining or immunoblotting using 6×-His specific antibody.

Key words: *Yersinia*, GroEL, pHEN6, cloning, protein expression.

المقدمة

داء اليرسينيات (yersiniosis) هو مرض تسببه جرثومة اليرسينيا (*Yersinia*)، التي تعدّ أكثر أنواعها ممرضة للإنسان، وأكثرها انتشاراً هي اليرسينيا المعوية القولونية (*Y. enterocolitica*) (Okwori *et al.*, 2009)، التي تسبب إنتان الأمعاء والكولون وإنتان العقد المسارية وتنتشر انتشاراً كبيراً عند الأشخاص الذين تراوح أعمارهم بين 5-15 سنة. من أهم أعراض هذا المرض هي الحمى والآلام البطنية الحادة فضلاً عن الإسهال الذي يكون مصحوباً بالدم في بعض الأحيان. تنتقل هذه الجراثيم على بعض الحيوانات كالخنازير وبعض القوارض، ومنها تنتقل إلى الإنسان عن طريق الطعام الملوث أو ملامسة الحيوانات المصابة ومخلفاتها (De Berardis *et al.*, 2004).

تتميز اليرسينيا بأنها عصيات مكورة، سالبة الغرام، غير متحركة بحرارة 37°م، متحركة بحرارة 25°م بواسطة سياط محيطية، هوائية اختيارية (Bottone, 1999; Hurst *et al.*, 2011)، إمرضيتها داخل خلوية إجبارية، تصيب خلايا الجهاز المناعي مثل الوحيدات (monocytes) والبالعات الكبيرة (macrophages)، حيث تكون قادرة على البقاء حية وعلى التكاثر داخل هذه الخلايا بصورة تؤمن بقاءها وتخفيها عن مراقبة النظام المناعي للمضيف من جهة وتستعصي على المضادات الحيوية المستخدمة في المعالجة من جهة أخرى (Celli *et al.*, 2009; Wehrly *et al.*, 2003). لدى اختراقها للخلايا البالعة، تعمل اليرسينيا على مقاومة دفاعات هذه الخلايا بعدة استراتيجيات، وذلك إما بهروبها من الجسيمات المبلعمة في السيتوبلازما، أو بمنع اندماج الجسيمات الحالة بالجسيمات المبلعمة، فضلاً عن مقاومتها لدرجات الحموضة (pH) المنخفضة والبروتينات المضادة للجراثيم التي تميز هذه الجسيمات الحالة. أما تكيف الجراثيم وقدرتها على البقاء في الوسط الحمضي فيعود بصورة أساسية لوجود نوع خاص من بروتينات المقاومة التي تدعى ببروتينات الصدمة الحرارية (heat shock proteins) (Yamamoto *et al.*, 1997).

تُلقب بروتينات الصدمة الحرارية بالوصيفات الجزيئية (chaperons) لأنها تحمي بنية البروتينات الأخرى وتساعد في أخذ الشكل الفراغي الوظيفي الخاص بها والمحافظة عليه، وذلك للوصول إلى مواضعها المخصصة لها متجنباً التأثيرات والتفاعلات غير المرغوب فيها، وخاصة تحت شروط الإجهاد التي تتعرض لها الخلية كارتفاع درجات الحرارة والحموضة التي غالباً ما يكون أثرها الرئيسي في تشويه البروتينات وتمسيخها. من حيث الشكل البنيوي، تعدّ الوصيفة الجزيئية GroEL (HSP 60) بمنزلة جزيئة بروتينية معقدة مؤلفة من حلقتين متوضعتين فوق بعضهما بعضاً، كل حلقة مؤلفة من سبع وحدات بروتينية متماثلة، وتحوي كل حلقة على تجويف مركزي منفصل عن الآخر، ويكون الفرع الداخلي لهذه الوحدات كارهاً للماء، وتتوضع جزيئة بروتينية مرافقة (GroES, 10 kDa) على طرف الحلقة بشكل قبة. يتطلب عمل الوصيفة وجود جزيئات

من الـ ATP، حيث ترتبط هذه الجزيئات، وكذلك البروتين غير المطوي، بنهاية كل حلقة، ثم يرتبط البروتين GroEL بنهاية الحلقة. ونظراً إلى أن الفرع الداخلي كاره للماء بشدة، فإنه يجذب الحموض الأمينية الكارهة للماء المكشوفة من البروتينات غير المطوية لترتبط به، وبمجرد أن تتجذب سلسلة الحموض الأمينية إلى داخل الحلقة تحدث تغييرات بنيوية في وحدات الـ GroEL المشكلة للوصيفة ويكبر التجويف المركزي ويتحول الوسط الداخلي من الكاره إلى المحب للماء، وهكذا يصبح الجزيء البروتيني الواقع بالفخ قادراً على تغيير شكله بأريحية تامة، وذلك وفقاً لبنيته الذاتية وليس نتيجة لأية قوة ارتباط خارجية. بعد إتمام طي البروتين، تتفصل القبة عن النهاية ويتحرر الـ ADP والبروتين المطوي. وقد لا تتم هذه العملية في مرة واحدة بل تتم بأكثر من مرة، لهذا فإن البروتينات الوصيفة تعرف أيضاً بأنزيمات الطي (foldase) (Braig et al., 1994; Lund, 2009). فضلاً عن ذلك، تتميز هذه البروتينات بتشابه كبير مع البروتينات النباتية الموجودة في البلاستيدات الخضراء، فهي تعد من البروتينات الشديدة المحافظة لدى الأحياء عموماً (Srivastava, 2008). من ناحية أخرى، تعدّ بروتينات الصدمة الحرارية الجرثومية من العوامل المرشحة القوية في البحث المناعي. ونظراً إلى أنها من البروتينات الاستمناعية المهمة فهي تشكل هدف الهجوم المناعي في كل من الاستجابات المناعية الخلوية والخلوية الوسطة (Bae and Toth, 2000).

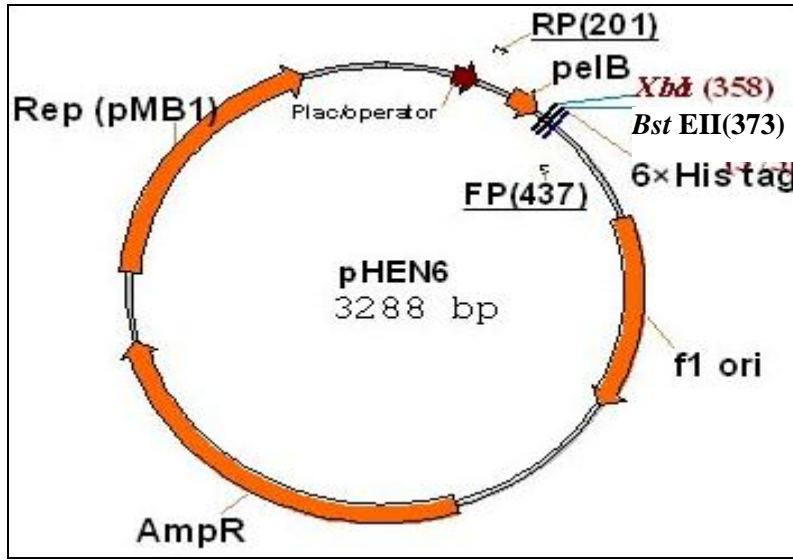
هدف هذا العمل إلى إنتاج بروتين الصدمة الحرارية GroEL المؤشب لليرسينيا باستخدام أنظمة التنسيل المورثي والتعبير البروتيني في الإشريكية الكولونية *E. coli*؛ وذلك باستخدام البلاسميد pHEN6 الذي يتيح الحصول على البروتين بشكل وظيفي منحل، مما قد يمكننا مستقبلاً من إجراء جملة من الدراسات بهدف تقييم دوره وإمكانية استخدامه لاحقاً في تطوير أساليب تشخيصية أو لقاحات فعالة لليرسينيا.

مواد البحث وطرقه

السلالات الجرثومية، شروط النمو والبلاسميد

استنتبت سلالات اليرسينيا المعوية القولونية (*Y. enterocolitica*) (سلالات مرجعية موجودة بدائرة الميكروبيولوجيا والمناعيات - قسم البيولوجيا الجزيئية - هيئة الطاقة الذرية السورية) على أوساط انتقائية صلبة (Yersinia selective agar; HIMEDIA©)، مضاف إليها مضادات حيوية نوعية (Yersinia selective supplement "SR0109E" Cefsulodin، (Novobiocin, Irgasan; OXOID®)، تم الحضانة بدرجة 37°م، ومن ثم نقلت إلى وسط سائل تكثيري انتقائي (*Yersinia* broth) ونميت مع الهز بدرجة 37°م. تم تهيئة سلالات *E. coli* المستخدمة في التنسيل والتعبير البروتيني (WK6 و TOP 10) (Vrije Universiteit Brussel, VUB, Belgium) لاستقبال البلاسميدات بطريقة الصق الكهربائي (electroporation) ومن ثم نميت على وسط LB (Luria Bertani broth) مزود بالمضاد

الحيوي Ampicillin® (Applichem®) بحرارة 37°م. أما البلاسميد الذي استخدم للتسبيل والتعبير البروتيني فهو pHEN6، الذي زودنا به مشكورا البروفسور سيرج ميلديرمانس (VUB, Belgium) (شكل 1).



الشكل (1) خريطة مفصلة لبلاسميد التعبير البروتيني pHEN6

حيث يظهر المحض Plac، المورثة المقاومة للأميسلين (AmpR)، التسلسل المرمز للذيل الهستيديني (6×His-tag)، التسلسل القائد (PelB)، المورثة المسؤولة على تضاعف البلاسميد ضمن جراثيم الـ *E. coli* (Rep pMB1) وموقع أنزيمي التقبيد XbaI و BstEII، فضلاً عن وجود موقعي المرئيين (RP, FP).

تنسيل مورثة GroEL في بلاسميد التعبير البروتيني pHEN6

بعد عملية تنمية الجراثيم استخلص الـ DNA الجينومي من اليرسينيا، بطريقة تعتمد على تحطيم المواد البروتينية والدهنية الموجودة في الخلية ثم رُسب الـ DNA الجينومي بواسطة الإيزوبروبانول (Sambrook and Russel, 2001). وقيست نقاوة الـ DNA الجينومي المستخلص بجهاز المطيافية Nanodrop بطول موجة 260 نانومتراً. استخدم 100 ng من الـ DNA الجينومي في تفاعل الـ PCR لتحديد الهوية الجرثومية للعزلات والتأكد من نقاوتها باستخدام مرئيات خاصة قادرة على تضخيم شدة متعددة في الـ DNA الجينومي الجرثومي عموماً واليرسينيا خصوصاً، وهو ما يدعى بتفاعل الـ PCR متعدد الشدة لليرسينيا (*Yersinia multiplex PCR*)، ويستخدم مثل هذا التفاعل بصورة شائعة في كشف العديد من العوامل الممرضة وتمييزها (Navarro et al., 2004; Noyes et al., 1998; Radu et al., 2000).

استُخدم الـ DNA الجينومي الجرثومي المستخلص كقالب لتضخيم المورثة GroEL باستخدام زوج من المُرئسات الأمامية Xba-F والعكسية BstE-R (الجدول 1). صُممت هذه المُرئسات اعتماداً على التسالي النيكلوتيدي المرجعي لليرسينيا (GenBank Accession: NC_008800, 420434-422086, www.ncbi.nlm.nih.gov) بعد إضافة تسلسل أنزيمات التقييد المستخدمة إلى كل مُرئسة، وبعد التأكد من خلو المورثة من أماكن قطع هذين الأنزيمين. تم التضخيم باستخدام تفاعل PCR عالي الوثوقية (Invitrogen® , AccuPrim™ Taq polymerase high fidelity) وذلك لتقليل احتمال حدوث خطأ في تسلسل النيكلوتيدات في أثناء تضخيم المورثة. تضمن برنامج الـ PCR التسخن الأولي (initial denaturation) مدة دقيقتين بحرارة 95°م. أُتبعَت هذه الخطوة بـ 35 دورة، تضمنت كل دورة منها التسخن (denaturation) بحرارة 94°م مدة 30 ثانية، الالتحام (annealing) بحرارة 55°م مدة 30 ثانية، والإستطالة (extantion) بحرارة 68°م مدة 90 ثانية. بعد إتمام التفاعل، رُحلت نتاجات الـ PCR على هلامة أغاروز تركيزها 1.5% بوجود موقى الرحلان الكهربائي TAE (Tris-Base 40mM, EDTA 1mM,) (acetic acid 0.1%, pH:7)، نقيت الشدفة المضخمة من باقي مكونات تفاعل الـ PCR بالاستخلاص بالفينول والترسيب بالإيثانول. بعدها عُمِل كل من البلاسميد pHEN6 وشدفة الـ PCR بأنزيمي التقييد XbaI وBstEII (Fermentas)، بعد انتهاء تفاعل القطع، تم تعطيل أنزيمات التقييد بتعريضها لحرارة 70°م، ثم أُجريت عملية اللحام (ligation) باستخدام طاقم جاهز (GE healthcare Ready-To-Go T4 DNA Ligase Kit) بنسبة 3:1 لكل من البلاسميد والشدفة، على التوالي. استخدمت نتائج اللحام في تحوير جراثيم *E. coli* سلالة (TOP 10) بطريقة الصعق الكهربائي (electroporation)، ونميت الجراثيم المحورة على أوساط حاوية على الأميبسلين (100 µg/ml). اختبر عدد من المستعمرات الجرثومية النامية على أطباق الزرع بتفاعل الـ PCR، باستخدام مُرئسات نوعية للبلاسميد pHEN6 (RP-FP) (الجدول 1). تضمن برنامج الـ PCR عملية التسخن الأولي مدة 3 دقائق بحرارة 95°م، ثم خمساً وثلاثين دورة، تألفت كل دورة من التسخن بحرارة 94°م مدة 30 ثانية، الالتحام بحرارة 60°م مدة 45 ثانية، الإستطالة بحرارة 72°م مدة 90 ثانية، وذلك لإنتقاء المستعمرات الجرثومية الحاوية على البلاسميدات الصحيحة (أشير إليها بمستعمرات موجبة). نميت المستعمرات الموجبة وعُزلت منها البلاسميدات بواسطة طاقم جاهز (plasmid miniprep kit; Qiagen®)، وقيس تركيزها. تم التأكد من تسهيل وصحة التسلسل النيكلوتيدي للمورثة GroEL بمعاملة هذه البلاسميدات بأنزيمات التقييد XbaI وBstEII للتأكد من أن المورثة مُنسلة بالشكل الصحيح، أيضاً تم التأكد من خلو تسلسل المورثة من الطفرات من خلال سلسلة العينات حيث استخدمت البلاسميدات كقالب فضلاً عن 4 مُرئسات مُختلفة والمرئستين (RP-FP) (الجدول 1) التي تغطي بمجموعها

كامل مورثة الـ GroEL الموجودة ضمن البلاسميد pHEN6، ثم قراءة النتائج باستخدام جهاز السلسلة الموجود في هيئة الطاقة الذرية السورية ومقارنة التسلسلات الناتجة بالتسلسل النيكلوتيدي المعروف في البنك الجيني.

الجدول 1 التسلسل النيكلوتيدي للمُرسات التي استخدمت في تسهيل مورثة الـ GroEL

| المرسك | أحد المرسات | التسلسل النيكلوتيدي للمرسك |
|--|--------------------------------|---|
| مرسك المصنعين لمورثة GroEL عند <i>Yersinia</i> | GroEL <i>Yersinia</i> - BstE-R | 5'-TTATTAGGTCACCCCATCATGCGGCCATACCGC-3' |
| مرسك <i>Yersinia</i> - Xba-F | GroEL <i>Yersinia</i> - Xba-F | 5'-TCCGCATCTAGAGCACTAAAGACGTAAAAAT-3' |
| مرسك المنظمة لمورثة GroEL لدى اليرسينيا | GroEL <i>Yers</i> -F1 | 5'-AGCAATTGCTCAGGTAAGGA-3' |
| | GroEL <i>Yers</i> -F2 | 5'-ATCTGCGGTACGCGAAACGT-3' |
| | GroEL <i>Yers</i> -R1 | 5'-GCAACCAACTTTGATAACGGC-3' |
| | GroEL <i>Yers</i> -R2 | 5'-CGGTTTCRGGTTTATTGAT-3' |
| المرسك الخاص بالبلاسميد pHEN6 | RP | 5'-TCACACAGGAAACAGCAATGAC-3' |
| | FP | 5'-CGCCAGGGTTTTCCCAAGTCACGAC-3' |

التعبير عن البروتين GroEL المؤشب

بعد إدخال البلاسميدات إلى جراثيم التعبير البروتيني *E. coli* WK6، نمت الجراثيم المحورة في دوارق الزرع في 250 مل من وسط الاستنبات Terrific Broth (KH₂PO₄) 17mM, K₂HPO₄ 72mM, Tryptone 1.2%, Yeast extract 2.4%, glycerol 10.8%, وذلك بحرارة 37 °م وبسرعة دوران لا تقل عن 200 دورة بالدقيقة. عند بلوغ العكارة المطلوبة (OD₆₀₀ = 1)، أُضيفت مادة الـ IPTG (IsoPropel β-D-ThioGalactoside) بتركيز 1mM لتحيض عملية التعبير في وسط الزرع. بعد 24 ساعة من الحضانة وبحرارة 37 °م، نُقل الوسط وجمع الراسب الجرثومي ومن ثم حُطم بواسطة الضغط الأسموزي لاستخراج بروتينات البلاسما المحيطة، حيث تتضمن هذه الطريقة حضانة الجراثيم 10 دقائق في موق ذي ضغط حلولي مرتفع حاو على تركيز عال من السكر "TES buffer" (Tris-Base 50mM, EDTA 5mM, sucrose 20%)، ثم تنقيتها بسرعة 8000 ×g ونقلها إلى محلول بارد ذي ضغط حلولي منخفض 5 mM من كبريتات المغنيزيوم (MgSO₄) لعشر دقائق. بعد تحطيم الجراثيم، جرى التنقيط على السرعة 8000 ×g للتخلص من البقايا الخلوية ثم مررت خلاصة البلاسما المحيطة على أعمدة النيكل (Ni-NTA) (Agarose) (Qiagen®) التي لها القدرة على التقاط البروتين المؤشب من خلال ذيله

الهستيديني. بعد مراحل مستفيضة من الغسل لأعمدة النيكل بموقى الغسل (Na_2HPO_4 16.2mM, NaHPO_4 3.8mM, NaCl 500mM, imidazole 20mM, pH 7.4)، حُررَ البروتين النقي عن طريق تمرير الموقى ولكن الحاوي على تركيز عال من الإמידازول (imidazole) 500 mM الذي يعدُّ المنافس القوي للذيل الهستيديني للارتباط بشوارد النيكل. جرت إدارة عملية تنقية بروتين GroEL المؤشب تلك من خلال نظام الكروماتوغرافيا الآلي (GE Healthcare) AKTA prime.

بعد عملية التعبير البروتيني لمورثة GroEL والحصول على البروتين بشكله النقي، استخدمت هلامة سلفات دودوسيل الصوديوم عديد الأكريلاميد 10% المتضمنة هلامة التكديس (stacking gel 5%) وهلامة الفصل (running gel 10%)، بغية ترحيل عينات ممثلة لمراحل التنقية كلها، وذلك ضمن موقى الترحيل (Tris-Base 25mM, glycine 200mM, SDS 0.1%)، وبعد الرحلان الكهربائي للعينات عبر هلامة عديد الأكريلاميد، صُبغت الهلامة بملون أزرق الكوماسي (Coomassie Brilliant blue R250 0.25%)، وذلك للتأكد من حسن سير عمليتي التعبير البروتيني والتنقية.

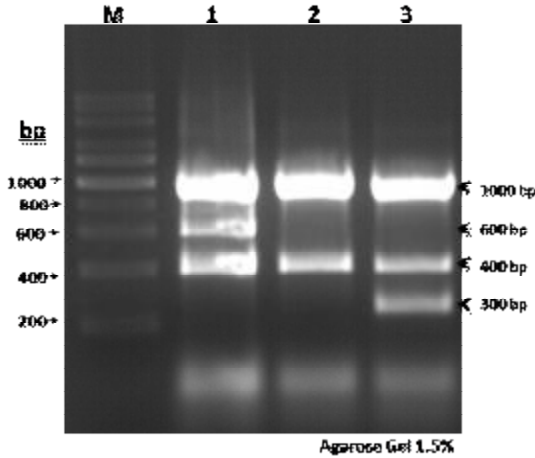
التبصيم المناعي للبروتين GroEL المؤشب

بعد عملية الترحيل لكل من الخلاصة البروتينية والبروتين النقي عبر الهلامة، نُقلت البروتينات كهربائياً إلى غشاء من نتروسيلوز (BioLab®) بواسطة جهاز تبصيم كهربائي (GE Healthcare) بوجود موقى النقل (Tris-Base 25mM, glycine 200mM, SDS 0.1% and methanol 20%)، بعد ذلك تم إحصار (blocking) الغشاء باستخدام موقى الإحصار (skimmed milk 3%, phosphate buffer saline (PBS) 1×, Tween-20 0.05%) الحاوي على 3% من الحليب منزوع الدسم، ثم غسل الغشاء بموقى الغسل (1× PBS, Tween-20 0.05%) ثلاث مرات وحضن بدرجة حرارة الغرفة بوجود أصداد موسومة بأنزيم البيروكسيداز ونوعية لذيل البروتين المؤشب الهستيديني (-6× mouse anti His HRP antibody) (Roche®)، حيث تم تمديد الضد 1/2000 ضمن موقى الإشباع المخفف 1% ووضع على الغشاء وحضن مدة ساعة بدرجة حرارة الغرفة، ثم غسل الغشاء مجدداً بموقى الغسل (ثلاث مرات) ومن ثم أضيف المداد الصباغي AEC (3-amino-9-ethylcarbazole) المحضر ضمن موقى الإظهار (Na_2HPO_4 50mM, AEC 0.25%, citric acid 25 mM, H_2O_2 0.015%, pH 5).

النتائج

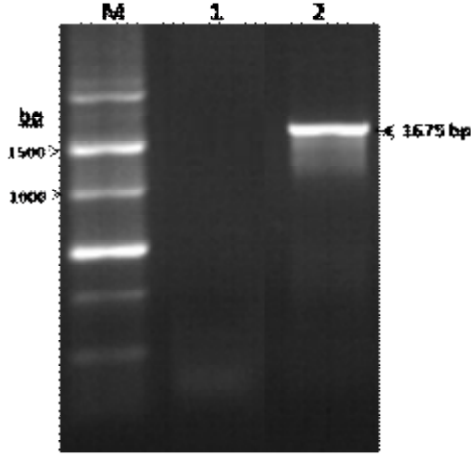
تضخيم المورثة GroEL من جينوم اليرسينيا

بدايةً قمنا بتحضير ثلاث سلالات من جراثيم اليرسينيا، حيث استخدمت سلالة أساسية هي اليرسينيا المعوية القولونية ذات النمط المصلي O9⁻ (*Y. enterocolitica* O9) من أجل عزل المورثة GroEL على اعتبار أنها من المورثات المحفوظة لدى النوع الجرثومي نفسه، وزُرعت على أوساط صلبة وسائلة بغية إكثارها. بعدها استُخلص الـ DNA الجينومي من الجراثيم، وأُخضع لتفاعل الـ PCR متعدد الشدفة (*Yersinia Multiplex PCR*) تمت أمثلته مسبقاً في دائرة الميكروبيولوجيا والمناعيات في هيئة الطاقة الذرية السورية. وبهدف تحديد الهوية الجرثومية لكل عزلة والتأكد من نقاوتها، استُخدمت سلالتان إضافيتان تابعتان للنوع الجرثومي نفسه كشاهدين إيجابيين لهذا التفاعل. وقد أظهر ترحيل نواتج تفاعل الـ PCR على هلامة الآغاروز مجموعة من الشدفة، واحدة منها مميزة لليرسينيا تظهر بطول تقريبي 1000 bp، في حين تظهر الشدفة المميزة للنوع *Y. entirocolitica* بطول تقريبي 400 bp، كما نلاحظ ظهور الشدفة ذات الطول 600 bp المميزة للعزلة *Y. entirocolitica* O9⁺ (شكل 2، مسار 1) التي تغيب عندما تفقد الجراثيم لبلاسميدها كما هو الحال في العزلة *Y. entirocolitica* O9⁻ (شكل 2، مسار 2)، في حين تظهر شدفة بطول 300 bp المميزة للعزلة *Y. entirocolitica* O3 (شكل 2، مسار 3).



الشكل (2) تحديد نقاوة سلالات اليرسينيا باستخدام طريقة "Yersinia multiplex PCR" ناتج ترحيل تفاعل الـ PCR متعدد الشدفة على هلامة آغاروز 1.5%، حيث طبق التفاعل على الـ DNA الجينومي المستخلص من ثلاث عزلات من اليرسينيا بحسب الترتيب: المسار 1: *Y. entirocolitica* O9⁺، المسار 2: *Y. entirocolitica* O9⁻، المسار 3: *Y. entirocolitica* O3. المسار M: سلم الـ DNA الجزيئي المعياري (حجم 200 bp).

وقد استخدم جينوم اليرسينيا المعوية القولونية كقالب لتضخيم مورثة الـ GroEL ، وذلك باستخدام مُرئسات نوعية تضخم كامل طول المورثة من المرمز الذي يلي مرمز البدء (ATG) وحتى المرمز الواقع مباشرة قبل مرمز الانتهاء (TAA). أعطى تفاعل الـ PCR شذفة بطول 1675 bp لدى ترحيل ناتج التفاعل (الشكل 3). تضم هذه الشذفة من الـ DNA طور القراءة المرمز لسلسلة متعدد بيتيد مؤلفة من 591 حمضاً أمينياً، وبلغ الوزن الجزيئي المتوقع نظرياً لبروتين GroEL المؤشب 62 kDa.



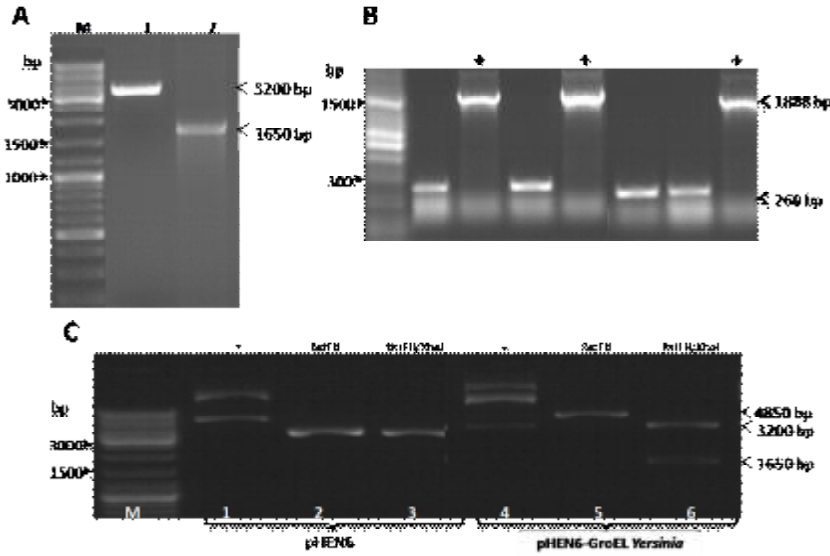
الشكل (3) تضخيم مورثة الـ GroEL بتفاعل الـ PCR

يظهر الشكل ناتج ترحيل تفاعل تضخيم مورثة الـ GroEL عبر هلامة أغاروز 1.5% المسار M: سلم الـ DNA الجزيئي المعياري. المسار 1: الشاهد السلبي الماء بدلاً من الـ DNA. المسار 2: باستخدام الـ DNA الجينومي لـ *Y. enterocolitica* O9 كقالب تضخيم، حيث يشير السهم إلى طول وموقع شذفة الـ DNA المضخمة.

تنسيل مورثة GroEL في البلاسميد pHEN6

بعد الحصول على كمية كافية من كل من شذفة المورثة والبلاسميد pHEN6، جرت معاملتهما بأنزيمي التقويد XbaI و BstEII ومن ثم لحامهما بنسبة (1:3) لإنتاج البنى المطلوبة (الشكل 4A). باستخدام نواتج التنسيل السابقة تم تحويل جراثيم *E. coli* TOP 10 ومن ثم تتميتها على أوساط انتقائية. أُجري بعد ذلك تفاعلات PCR لعدد من المستعمرات النامية للتأكد من تلقيها البلاسميدات، حيث تظهر بنتيجة إجراء التفاعل مباشرة على المستعمرات شذفة بطول 1888 bp في حال كانت إيجابية – أي حاوية على البلاسميد وبه المورثة – في حين تظهر المستعمرات السلبية الحاوية على البلاسميد فقط شذفة بطول 260 bp (الشكل 4B).

للتحقق من صحة تنسيل شذفة المورثة في البلاسميد، عُرِلت البلاسميدات من المستعمرات الإيجابية وُعولت بأنزيمي التقبيد *BstEII* و *XbaI* واستخدم البلاسميد الفارغ كشاهد سلبي، ثم رُحلت على هلامة الأغاروز 1.5% (الشكل 4C). نلاحظ على هلامة الرحلان أن الشذفة الناتجة عن معاملة البلاسميدات بأنزيم واحد (المسار 5) أطول من الشذفة الناتجة عن معاملة البلاسميد الشاهد بالأنزيم نفسه (المسار 2)، في حين تظهر معاملة البلاسميدات بالأنزيمين شذفتين بطولين مختلفين هما البلاسميد الفارغ ومورثة الـ *GroEL* (المسار 6)، في حين تظهر شذفة واحدة عند معاملة البلاسميد الفارغ بالأنزيمين نفسهما (المسار 3). لزيادة التحقق، أُرسلت البلاسميدات المؤكدة للسلسلة باستخدام مجموعة من المرئسات الخاصة التي تسمح كامل طول المورثة، وقد أكدت هذه النتائج صحة طول البلاسميدات وخلوها بالكامل من الطفرات وكانت مطابقة بنسبة 100% تقريباً عند مقارنتها للتسلسل النيكلوتيدي الموجود في البنك الجيني.

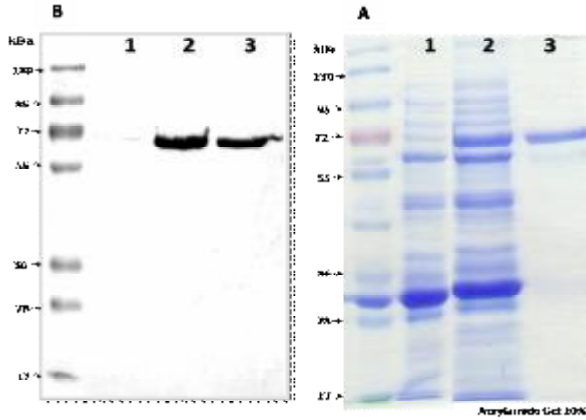


الشكل (4) مراحل عملية تنسيل المورثة في البلاسميد

(A) ناتج معاملة شذفة الـ PCR المتضمنة للمورثة *GroEL* (مسار 1) والبلاسميد *pHEN6* (مسار 2) بأنزيمي التقبيد *BstEII* و *XbaI*. (B) نواتج تفاعل الـ PCR الذي أُجري على المستعمرات الجرثومية باستخدام المرئسات *FP-RP*. أُشير إلى المستعمرات الموجبة (+). (C) نواتج تقطيع البلاسميدات النقية بأنزيمي التقبيد *BstEII* و *XbaI*. المساران 1 و 4: البلاسميد الفارغ والبلاسميد الحاوي على المورثة قبل عملية التقطيع، المساران 2 و 5: بوجود الأنزيم *BstEII*، المساران 3 و 6: بوجود كلا الأنزيمين *BstEII/XbaI*. تشير الأسهم الجانبية إلى الأطوال الجزيئية المتوقعة لشذف الـ DNA. مسار M: سلم الـ DNA الجزيئي المعياري.

التعبير البروتيني والتبصيم المناعي

بغية تحريض انتساخ المورثة GroEL في البلاسميد المحور، أُدخل هذا الأخير إلى جراثيم *E. coli* WK6 بعملية الصق الكهربائي ثم نمت المستعمرات الجرثومية الحاوية على البلاسميد في وسط الاستنبات بوجود الأمبسلين، وقد تم تحريض التعبير البروتيني بإضافة مادة الـ IPTG والحضن بشروط التمنية المثلى. بعدها تم تثقيف الجراثيم ومن ثم تحطيمها بطريقة الصدمة الحلولية بغية تحرير البروتينات المتركة في فراغ البلاسما المحيطية للجراثيم (Ewis and Lu, 2005). انطلاقاً من هذه الخلاصة الجرثومية، نقي البروتين المؤشب بأعمدة الكروماتوغرافيا ذات الإلفة المعدنية، إذ إن وجود الذيل الهيسيتيديني لبروتين GroEL المؤشب من الناحية الكربوكسيلية يمكنه من الارتباط بشوارد النيكل المنتشرة على ملاط العمود. بعد مراحل مستقيضة من الغسل، حررنا البروتين النقي من العمود بتمرير موق حاو على مركب الإيميدازول المنافس الشره لشوارد النيكل والقادر على إزاحة البروتين النقي. أمتابعة عملية التعبير والتنقية وتقييمهما رُحلت عينات من هذه الخلاصات الجرثومية عبر هلامة عديد الأكريلاميد (الشكل 5)، وذلك قبل (مسار 1) وبعد 24 ساعة (مسار 2) من عملية التحريض، وبعد عملية التنقية (مسار 3)، ثم صُبغت بأزرق الكوماسي (الشكل 5A) أو نقلت إلى غشاء نتروسلوز ومن ثم بُصمت باستخدام الضد النوعي لذيل الهيسيتيديني (الشكل 5B). يوضح الشكل 5 ظهور عصابة مميزة للبروتين المؤشب بطول 60 kDa حصرياً بعد التحريض، وقد أمكن تنقية هذا البروتين باستخدام كروماتوغرافيا الإلفة.



الشكل (5) التعبير البروتيني والتبصيم المناعي

نتاج ترحيل المستخلصات البروتينية على هلامة عديد الأكريلاميد، المسار 1: قبل عملية التحريض، المسار 2: بعد 24 ساعة من التحريض والمسار 3: بعد عملية تنقية البروتين المؤشب بطول 60 kDa، فضلاً عن وجود واسم البروتين المعياري. أظهرت البروتينات إما من خلال الصبغ بأزرق الكوماسي (A) أو من خلال التبصيم المناعي باستخدام أضداد موجهة للذيل الهيسيتيديني للبروتين المؤشب (B).

المناقشة

نجحنا في تنسيل مورثة بروتين الصدمة الحرارية 60 HSP من اليرسينيا المعوية القولونية ذات النمط المصلي O9⁻ في بلاسميد التعبير البروتيني pHEN6، ومن ثم في تحريض التعبير البروتيني عن GroEL المؤشب، الأمر الذي يحاكي ما قد تم في بحوث سابقة من محاولات لإنتاج بروتينات الصدمة الحرارية لعدد من الأجناس الجرثومية المختلفة، مثل الأشريكة القولونية *E. coli* (Chen et al., 1996; Kamireddi et al., 1997) والضمات *Vibrio* (Mizunoe et al., 1999) و*Salmonella* (Paliwal et al., 2008) والبروسيل *Brucella*، وحتى من اليرسينيا المعوية القولونية ذات النمط المصلي O3 و O8 (Yamamoto et al., 1993). ومن أهم المشكلات التي رافقت بعض هذه المحاولات هو فقدان بروتين الصدمة الحرارية المؤشب لبنيته الفراغية ولانحلاله في أثناء مراحل التعبير، وتراكمه في الخلايا ضمن ما يعرف بالأجسام الضمنية (inclusion bodies)؛ مما يستدعي استخدام مواد مَحَلَّة في أثناء التنقية، مثل اليوريا (urea) والغوانيديين (guanidine) اللذين يؤثران في الشكل الفراغي للبروتين (Noll et al., 1994). حاولنا في هذا العمل تجنب الوقوع في المشكلة ذاتها من خلال استخدام البلاسميد pHEN6 (Arbabi Ghahroudi et al., 1997) الذي يتصف بمجموعة من الخصائص الفريدة لهذه الغاية، فهو يتيح إفراز البروتين المعبر عنه في فراغ البلاسما المحيطية دون تراكمه في السيتوبلازما، وذلك نظراً إلى وجود تسلسل قائد (leader signal, signal PeIB) في الناحية الأمامية من البروتين. فضلاً عن ذلك فإن الفعالية المعتدلة للمحضض Plac يسمح بالتعبير الهادئ للبروتين المؤشب بصورة تمكنه من أخذ الشكل الفراغي الوظيفي المنحل دون أن يؤدي إلى تمسخه وتكدسه في الأجسام الضمنية، كما هو الحال في بعض أنظمة التعبير البروتيني ذات المحضضات الأكثر فاعلية (Burgess, 2009). من ناحية أخرى، يحتوي البروتين المؤشب الناتج عن التعبير بهذا البلاسميد، على الذيل سداسي الهستيدين (6× Histidine tag) من الناحية الكربوكسيلية نظراً إلى وجود التسلسل المرمز لهذا الذيل في بنية البلاسميد، الأمر الذي يتيح لنا من جهة سهولة التنقية باستخدام الأعمدة الحاوية على شوارد النيكل ذات الألفة للذيل الهستيديني، ومن جهة أخرى الكشف عن البروتين المؤشب في الخلاصة الجرثومية باستخدام أضداد نوعية لهذا الذيل.

سنحاول في دراسات مستقبلية، وباستخدام البلاسميد pHEN6 أيضاً، إنتاج بروتين الصدمة الحرارية المؤشب GroES والحصول عليه بالشكل المنحل الوظيفي، تماماً كحصولنا على البروتين GroEL، ومن ثم فإن توافر هذين المكونين سيمكننا من دراسة خصائص المعقد GroES/GroEL كأنزيم طبي (foldase) للبروتينات الممسخة في الزجاج (Huang and Chuang, 1999). كما يمكن من خلال دراسات متعلقة بالبنية الوظيفية والاستمناعية للبروتين GroEL تقطيع المورثة إلى أجزاء والتعبير البروتيني عن كل جزء،

ومن ثمّ تحديد موقع الناشبة (epitope) المسؤولة عن توليد الاستجابة المناعية النوعية لليرسينيا وذلك كدراسة مشابهة لما ذكره Lin (Lin *et al.*, 1996). كما سيبيح لنا توافر هذا البروتين النقي وبكميات كبيرة إنتاج أضداد نوعية له كالأضداد المتعددة النسائل (polyclonal antibodies) التي تنتج في الأرنب بعد تمنيعه بالبروتين النقي. ويمكن استثمار هذه الأضداد في تشخيص اليرسينيا المعوية القولونية وتمييزها عن البروسيل التي تسبب غالباً خطأً في التشخيص نظراً إلى التشابه الكبير فيما بينهما (Davis and Troy, 2005). من ناحية أخرى، يمكن لهذه الأضداد النوعية فضلاً عن بروتين الـ GroEL أن تكون أدوات مهمة من أجل تقييم استخدام مورثة الـ GroEL كلقاح DNA فعال لداء اليرسينيات وفي عدة موديلات، حيث تدخل هذه المورثة إلى بلاسميد التعبير البروتيني في حقيقيات النوى؛ مما يؤدي إلى التعبير عن هذا البروتين ضمن جسم المضيف لدى حقنه بهذه البلاسميدات محفزاً بذلك الاستجابة المناعية ضد هذا البروتين الغريب (Al-Mariri *et al.*, 2002). في هذا الصدد، ونظراً إلى أنّ الطبيعة المحافضة لهذا البروتين (Braig *et al.*, 1994) قد تؤثر في نوعية الاستجابة المناعية المتشكلة، فإن استخدام الـ GroEL كمستضد مدعم لبروتينات نوعية أخرى في العديد من اللقاحات قد يساعد في توليد استجابة مناعية واسعة لعدد كبير من الجراثيم ذات الأمراض الداخلية الخلوية كالسالمونيلا (*Salmonella*) والميكوبكتيريوم (*Mycobacterium*) والليجيونيلا (*Legionella*) (Bae and Toth, 2000).

المراجع REFERENCES

- Al-Mariri, A., Tibor, A., Lestrade, P., Mertens, P., De Bolle, X., and Letesson, J.J. (2002). *Yersinia enterocolitica* as a vehicle for a naked DNA vaccine encoding *Brucella abortus* bacterioferritin or P39 antigen. *Infect. Immun.* 70, 1915-1923.
- Arbabi Ghahroudi, M., Desmyter, A., Wyns, L., Hamers, R., and Muyldermans, S. (1997). Selection and identification of single domain antibody fragments from camel heavy-chain antibodies. *FEBS Lett.* 414, 521-526.
- Bae, J.E., and Toth, T.E. (2000). Cloning and kinetics of expression of *Brucella abortus* heat shock proteins by baculovirus recombinants. *Vet. Microbiol.* 75, 199-204.
- Bottone, E.J. (1999). *Yersinia enterocolitica*: overview and epidemiologic correlates. *Microbes Infect.* 1, 323-333.
- Braig, K., Otwinowski, Z., Hegde, R., Boisvert, D.C., Joachimiak, A., Horwich, A.L., and Sigler, P.B. (1994). The crystal structure of the bacterial chaperonin GroEL at 2.8 Å. *Nature* 371, 578-586.
- Burgess, R.R. (2009). Refolding solubilized inclusion body proteins. *Methods Enzymol.* 463, 259-282.
- Celli, J., de Chastellier, C., Franchini, D.M., Pizarro-Cerda, J., Moreno, E., and Gorvel, J.P. (2003). *Brucella* evades macrophage killing via VirB-dependent sustained interactions with the endoplasmic reticulum. *J. Exp. Med.* 198, 545-556.
- Chen, Y.H., Hua, Z.C., Dong, C., Ma, Z., and Zhu, D.X. (1996). Cloning and Expression of the rpoH Gene from *Escherichia coli* and Its Product Purification. *Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao (Shanghai)* 28, 170-176.
- Davis, C.E., and Troy, S.B. (2005). Brucellosis. *N. Engl. J. Med.* 353, 1071-1072; author reply 1071-1072.
- De Berardis, B., Torresini, G., Brucchi, M., Marinelli, S., Mattucci, S., Schietroma, M., Vecchio, L., and Carlei, F. (2004). *Yersinia enterocolitica* intestinal infection with ileum perforation: report of a clinical observation. *Acta Biomed* 75, 77-81.
- Ewis, H.E., and Lu, C.D. (2005). Osmotic shock: a mechanosensitive channel blocker can prevent release of cytoplasmic but not periplasmic proteins. *FEMS Microbiol. Lett.* 253, 295-301.
- Huang, Y.S., and Chuang, D.T. (1999). Mechanisms for GroEL/GroES-mediated folding of a large 86-kDa fusion polypeptide in vitro. *J. Biol. Chem.* 274, 10405-10412.

- Hurst, M.R., Becher, S.A., Young, S.D., Nelson, T.L., and Glare, T.R. (2011). *Yersinia entomophaga* sp. nov., isolated from the New Zealand grass grub *Costelytra zealandica*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 61, 844-849.
- Kamireddi, M., Eisenstein, E., and Reddy, P. (1997). Stable expression and rapid purification of *Escherichia coli* GroEL and GroES chaperonins. *Protein Expr Purif* 11, 47-52.
- Lin, J., Adams, L.G., and Ficht, T.A. (1996). Immunological response to the *Brucella abortus* GroEL homolog. *Infect. Immun.* 64, 4396-4400.
- Lund, P.A. (2009). Multiple chaperonins in bacteria--why so many? *FEMS Microbiol. Rev.* 33, 785-800.
- Mizunoe, Y., Wai, S.N., Umene, K., Kokubo, T., Kawabata, S., and Yoshida, S. (1999). Cloning, sequencing, and functional expression in *Escherichia coli* of chaperonin (groESL) genes from *Vibrio cholerae*. *Microbiol. Immunol.* 43, 513-520.
- Navarro, E., Casao, M.A., and Solera, J. (2004). Diagnosis of human brucellosis using PCR. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 4, 115-123.
- Noll, A., Roggenkamp, A., Heesemann, J., and Autenrieth, I.B. (1994). Protective role for heat shock protein-reactive alpha beta T cells in murine yersiniosis. *Infect. Immun.* 62, 2784-2791.
- Noyes, H.A., Reyburn, H., Bailey, J.W., and Smith, D. (1998). A nested-PCR-based schizodeme method for identifying *Leishmania* kinetoplast minicircle classes directly from clinical samples and its application to the study of the epidemiology of *Leishmania tropica* in Pakistan. *J. Clin. Microbiol.* 36, 2877-2881.
- Okwori, A.E., Martinez, P.O., Fredriksson-Ahomaa, M., Agina, S.E., and Korkeala, H. (2009). Pathogenic *Yersinia enterocolitica* 2/O:9 and *Yersinia pseudotuberculosis* 1/O:1 strains isolated from human and non-human sources in the Plateau State of Nigeria. *Food Microbiol.* 26, 872-875.
- Paliwal, P.K., Bansal, A., Sagi, S.S., Mustoori, S., and Govindaswamy, I. (2008). Cloning, expression and characterization of heat shock protein 60 (groEL) of *Salmonella enterica* serovar *Typhi* and its role in protective immunity against lethal *Salmonella* infection in mice. *Clin. Immunol.* 126, 89-96.
- Radu, S., Rusul, G., Ling, O.W., Purwati, E., Mustakim, M., and Lihan, S. (2000). Rapid isolation and detection of *Escherichia coli* O157:H7 by use of rainbow agar O157 and PCR assay. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* 31, 77-79.
- Sambrook, J., and Russel, D.W. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Vol 3rd ed (New York: Cold Spring Harbour).

- Srivastava, P.K. (2008). New jobs for ancient chaperones. *Sci. Am.* 299, 50-55.
- Wehrly, T.D., Chong, A., Virtaneva, K., Sturdevant, D.E., Child, R., Edwards, J.A., Brouwer, D., Nair, V., Fischer, E.R., Wicke, L., et al. (2009). Intracellular biology and virulence determinants of *Francisella tularensis* revealed by transcriptional profiling inside macrophages. *Cell. Microbiol.* 11, 1128-1150.
- Yamamoto, T., Hanawa, T., Ogata, S., and Kamiya, S. (1997). The *Yersinia enterocolitica* GsrA stress protein, involved in intracellular survival, is induced by macrophage phagocytosis. *Infect. Immun.* 65, 2190-2196.
- Yamamoto, T., Miura, H., Ohsumi, K., Yamaguchi, H., Taguchi, H., and Ogata, S. (1993). Cloning and nucleotide sequence analysis of immunodominant heat-shock protein of *Yersinia enterocolitica*. *Res. Microbiol.* 144, 691-701.